

游离脂肪酸 (NEFA) 测定试剂盒说明书

(货号: A042-1-1 比色法 50 管/48 样)

[注]: 此实验须用分光光度计比色,不能用半自动、全自动生化分析仪及酶标仪比色!

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、测定原理:

游离脂肪酸 (NEFA) 能与铜离子结合形成脂肪酸的铜盐而溶于氯仿中,其含量与游离脂肪酸含量成正比。用铜试剂测定其中铜离子的含量,即可推算出游离脂肪酸的含量。

二、试剂盒组成与试剂配制:(试剂盒有效期 3 个月)

试剂一: 三氯甲烷(分析纯),自备。

试剂二: 缓冲液,40mL×1 瓶,室温保存。

试剂三: 铜试剂,甲液 30mL×1 瓶,乙液 30mL×1 瓶,丙液 5mL×1 瓶,4℃保存。**试剂三铜试剂的配制:** 按甲液:乙液:丙液=10:9:1 的比例进行配制,需多少配多少,配好后 4℃可保存二周。

试剂四: 显色剂,粉剂×2 支,稀释液 10mL×2 瓶,4℃保存。

试剂四显色剂的配制: 临用时将 1 支粉剂溶于 1 瓶 10mL 稀释液中,配好后 4℃可保存二周。

试剂五: 棕榈酸标准品粉剂×2 支,溶剂 50mL×1 瓶,4℃保存。**1000 μmol/L 棕榈酸标准品的配制:** 将一支粉剂用溶剂溶解后定容至 20mL (注意用溶剂将装粉剂的小离心管洗净)。

试剂六: 蒸馏水 40mL×1 瓶 (做空白管用)。

三、所需仪器及试剂:

可见光分光光度计及 1cm 光径比色皿,涡旋混匀器,离心机,三氯甲烷 (分析纯),玻璃注射器及硬膜外麻醉针心针套 (本公司有售)。

四、操作步骤:

1、样本前处理:

血清(浆)等液体样本: 可直接使用 (若有固体物存在,可 4000 转/分离心 5 分钟后取上清检测)。

组织样本: 准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的匀浆介质 (如生理盐水或无水乙醇等),冰水浴条件下机械匀浆,4000 转/分,离心 10 分钟,取上清液待测。

细胞样本: 不推荐用此法,可用本公司另一款货号为 A042-2-1 的试剂盒检测。

2、操作表:(可用带盖玻璃试管或耐腐蚀的 10mL 离心管操作)

	空白管	标准管	测定管
蒸馏水 (mL)	0.2	0.2	
1000 μmol/L 棕榈酸标准品 (mL)		0.2	
待测样本 (mL)			0.2
试剂二缓冲液 (mL)	0.5	0.5	0.5
试剂三铜试剂 (mL)	1.0	1.0	1.0
三氯甲烷 (mL)	4.0	3.8	4.0
充分混匀抽提 2 分钟,4000 转/分离心 10 分钟,仔细吸去上层蓝色液体及蛋白凝块弃之,吸取下层抽提液 2mL 进行显色。 详细操作见注。			
下层抽提液 (mL)	2.0	2.0	2.0
显色剂 (mL)	0.25	0.25	0.25
混匀,室温放置 2 分钟,在 440nm,1cm 光径,三氯甲烷调零后分光光度计测定各管吸光值 A。			

[注]: 详细抽提操作步骤:

1、充分混匀 1~2 分钟 (混到管内溶液不分层即可)。如果您没有磨口试管,可用一次性 10mL 离心管代替 (用前需将离心管加氯仿测试其是否发生反应)。

2、混匀完后以 4000 转/分离心 10 分钟,若发现下层液体呈半凝固状态、凝固层较厚或下层液体不足 2mL 时,则可用小玻棒或移液器吸嘴轻轻搅拌后再次离心,直至分层清楚。

3、然后用移液器小心吸取上层液体及凝固层并弃之。

4、取注射器及硬膜外麻醉针心针套,将硬膜外麻醉针心插入针套中,小心插入下层抽提液中,拔出针心,接上注射器,吸取下层抽提液 2.3~2.5mL 至另一试管中。(这样可避免上层液体及凝固层混入下层液体中,若混入上层液体及凝固层,则需重新离心后再取下层抽提液,否则会影响结果。)若偶然发现抽提液有雾状混浊,可放入 37℃水浴 1~2 分钟即可。

5、再用套好注射器的穿刺针从上述试管中准确吸取 2mL 下层抽提液加入另一试管中,加显色剂进行显色。

6、比色皿在用蒸馏水冲洗干净后,还必须用无水乙醇冲洗,然后加三氯甲烷调零,否则加入的三氯甲烷中会混有水珠 (三氯甲烷和水不互溶)。

以上几点为实验成败的关键,望用户多加注意!

五、计算公式:

1、血清(浆)及其它液体样本计算公式:

$$\text{液体样本中 NEFA 含量 } (\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

2、组织样本按蛋白浓度计算公式:

$$\text{组织样本中 NEFA 含量 } (\mu\text{mol/g 蛋白}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \text{Cpr}$$

3、组织样本按质量计算公式:

$$\text{组织样本中 NEFA 含量 } (\mu\text{mol/g 组织}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{W}{V_{\text{样总}}}$$

以上公式中:

C_{标准}: 标准品浓度, 1000 μmol/L;

Cpr: 组织样本蛋白浓度, g/L。

W: 组织样本重量, g;

V_{样总}: 组织样本匀浆时匀浆液的总体积, L。

七、注意点:

- 1、实验必须用分光光度计比色,不可用酶标仪、半自动及全自动生化分析仪比色 (有机溶剂对这些仪器会有损坏)。
- 2、显色前吸取下层抽提液时,吸管不要触及管壁,以免沾染管壁上粘着的铜试剂。下层抽提液必须清澈,否则会使结果偏高。
- 3、胆红素可被试剂一抽提而干扰比色,故黄疸血清须做一对照管,即最后不加显色剂而用正丁醇代替,在测定管光密度读数中减去此对照管的光密度读数。
- 4、若是用无水乙醇等有机溶剂提取组织,则无需再测其蛋白浓度,按质量公式计算。

附录：实验中可能出现的问题

在做游离脂肪酸的时候空白很高，也有的老师操作结果中标准和测定结果都很高，甚至能达到 3.000 以上，大多数情况下是由于操作问题引起的，下面是关于 NEFA 实验所要注意的几个问题：

- 1、在做组织样本的时候，不能将样本一起做成匀浆，因为组织在做成匀浆后，很多指标含量都会快速下降。一般应该是上午做好匀浆，下午就要测定完。样本太多一次不能操作完的，当天能做几个样本就做几个匀浆，最好是按分组取样，每组均要有样本参与，这样能减少批间差。
- 2、关于移液枪的使用，建议刚做实验的老师用倒退法加样，以减少误差。并且在实验前最好能够多加练习，如反复移蒸馏水，当加样熟练后，可进一步用无水乙醇和血清进行练习，这样可以提高加样的准确性。
- 3、在 NEFA 的混匀过程中，玻璃试管操作最好用橡皮塞塞住试管口后，按住试管上部混匀。切忌握住试管中部或者下部，因为这样会使混匀不充分，导致抽提不充分。
- 4、实验时所用器皿应当仔细洗刷并且烘干，如果有污染，则可能会对实验造成不必要的损失。例如：在配制铜试剂时，容器不干净，则可能导致配制出的铜试剂浑浊，而非澄清透亮。如果在实验过程中试管不干净，也可能引入杂蛋白，甚至造成空白管也能出现中间蛋白层的现象。
- 5、试剂配制时应按照说明书的顺序进行。例如：在铜试剂配制时，如果按照打乱顺序配制，即不按照甲、乙、丙的顺序，那么也有可能使配制好的铜试剂出现浑浊现象，从而不能使用。
- 6、实验时的自备试剂不能有污染，特别是蒸馏水，很多实验失败都是因为最容易忽略的蒸馏水受到了污染，引入杂离子或者杂蛋白。
- 7、离心后的上层铜试剂建议客户用移液器吸出。在吸下层抽提液时，应该用适当大小的穿刺针，如果穿刺针过大，例如用牛的穿刺针，有可能携带过多的上层铜试剂或者中间的蛋白层，如果吸到上层的铜试剂，在比色中会使吸光度特别高，引起结果偏差很大，并且做不同实验时所用的穿刺针不应交叉使用，最好每个实验所用的玻璃移液管或者穿刺针能够固定不变。（本公司提供相应的穿刺针购买）（穿刺针即硬膜外麻醉针）
- 8、在比色过程中，应保证分光光度计使用恰当无误。比方说有的老师在调零时，只用一个比色皿调零，另一个比色皿没有冲洗和调零就直接使用，会造成初始值就偏高的现象，因为比色皿会吸附颜色。
- 9、在配制试剂过程中，最好能够严格按照我们说明书上的量进行准确量取，以加强实验的准确性，不能随便倒取。